

教職員健診における 血清高分子量型アディポネクチン濃度の測定 (CLEIA法)

Serum high-molecular-weight form of adiponectin level measured
by CLEIA in health checkup of teachers and other workers

広瀬 寛* 後藤 伸子* 森 正明*

慶應保健研究, 39(1), 071-076, 2021

要旨: アディポネクチン (ADPN) は脂肪細胞から分泌される善玉のホルモンで, 細胞実験や動物実験で糖尿病や動脈硬化・腫瘍などを抑制し, 百寿者では血中濃度が高いなど, 抗加齢ホルモンとしての意義が注目されている。また, 糖尿病マウスの脂肪細胞内でシステイン残基へのコハク酸結合により高分子量 (HMW) 型の産生が低下する機序が報告された。本研究では, 40~65歳の教職員を対象に健診時に血清中のHMW-ADPN濃度を測定し, その意義を断面研究で検討した。

当施設の定期健康診断を受診した40~65歳の教職員を対象に, 血清HMW-ADPN濃度をCLEIA法で測定した (株式会社エスアールエルに委託)。解析対象の日本人は男性1,586名, 女性1,019名 (平均年齢は男性51歳, 女性49歳) であった。

(1) 血清HMW-ADPN濃度の中央値は男性で $2.6\mu\text{g}/\text{mL}$, 女性で $4.9\mu\text{g}/\text{mL}$ であり, 男女ともメタボリックシンドローム (MetS) 群は非MetS群と比較して有意に低値であった。(2) 男女とも, $\log[\text{HMW-ADPN}]$ はHDL-CやBNP, 年齢とは正の相関が, BMI, 腹囲, 空腹時血糖, HbA1c, 血清TG, 赤血球数, ALT, γ -GTP, 尿酸などと有意な負の相関が認められた。(3) 男女ともに, 運動習慣がある群の方がHMW-ADPNが高い傾向が認められた。(4) $\log[\text{HMW-ADPN}]$ を目的変数としたステップワイズ多重回帰分析では, HDL-C, 尿酸, BMI, 性別, BNP, γ -GTP, 年齢, HbA1cの順に採択された ($F \geq 10$, $P < 0.0001$, $R^2 = 0.417$)。

以上より, 血清HMW-ADPN濃度はHDL-Cや女性, BNP, 年齢とは正の, BMIや尿酸, γ -GTP, HbA1cとは負の, それぞれ独立して有意な関係を示した。

keywords: アディポネクチン, HDL-コレステロール, 糖尿病
adiponectin, HDL-cholesterol, diabetes mellitus

はじめに

アディポネクチン (ADPN) は, 脂肪細胞で最も発現が多い蛋白質として1996年に大阪大

学で発見されたが¹⁾, それとは独立して同年昭和大学薬学部でヒトの血清から抽出された分子量約28,000のゼラチン結合蛋白 (GBP28) と

*慶應義塾大学保健管理センター

(著者連絡先) 広瀬 寛 〒223-8521 神奈川県横浜市港北区日吉4-1-1

同一物質であった²⁾。ADPNは善玉のホルモン様物質であり、細胞実験や動物実験で糖尿病(DM)や動脈硬化・腫瘍などを抑制する。また、喫煙者では血中濃度が低く、100歳以上の百寿者では血中濃度が高い³⁾など、長寿関連ホルモンとしての意義が注目されている^{4), 5)}。

ADPNの特徴としては、(1)血中濃度は、男性よりも女性の方が高く、テストステロンがADPNの分泌を抑制することが報告されている。(2)肥化した脂肪細胞からはADPNの分泌が低下する。(3)DMマウスの脂肪細胞内ではADPNのシステイン残基へのコハク酸結合が増加することにより、高分子量(HMW)型ADPNの産生が低下する機序が報告されている⁶⁾。ADPNは、血液中で3量体や6量体などの低分子量型および12量体や18量体などのHMW型として存在しているが²⁾、アディポネクチンの活性型はHMW型であるという報告が多くなされている⁷⁾⁻⁹⁾。

我々は2000年ごろから、健常人や内分泌代謝領域においてELISA法で測定したHMW-ADPN濃度の意義を検討してきた^{4), 10)-12)}。本研究では、40~65歳の本学教職員を対象に、健康診断時に血清中のHMW-ADPN濃度をCLEIA法¹³⁾で測定し、その意義を断面研究で検討した。

対象と方法

当施設の定期健康診断を受診した40~65歳の教職員(信濃町地区を除く)を対象に、インフォームドコンセントが得られた方の血清HMW-ADPN濃度を測定した。DMで治療中の73名および設定していた除外基準に合致した28名は除外し、解析対象の日本人は男性1,586名、女性1,019名(平均年齢は男性51歳、女性49歳)であった。

除外基準は、悪性疾患や炎症性疾患を持つ人、膠原病やDMで治療中、または重度の肝障害・腎障害・血液疾患の人。検査データでは、血清ALT \geq 150IU/L、クレアチニン(Cr) \geq

1.5mg/dL、白血球数 \geq 12,000/ μ L、ヘモグロビン(Hb) \leq 9.0g/dL、血小板数 \geq 50 \times 10⁴/ μ Lまたは $<$ 10 \times 10⁴/ μ L、空腹時血糖(FPG) \geq 170mg/dL、HbA1c \geq 8.0%、前立腺特異抗原(PSA) \geq 10ng/mL、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP) \geq 200pg/mL、腹囲データなし(4名)。

血清HMW-ADPN濃度の測定は株式会社エスアールエルに委託し、CLEIA法で行った¹³⁾。「高分子量アディポネクチン測定キット」は昭和大学薬学部の中野泰子先生と中外診断科学(現在、富士レビオ社)の共同開発であり、HMW-ADPNを特異的に認識し、熱処理の操作が不要なのが特徴である^{14), 15)}。2004年からELISAキット^{14), 15)}が、2010年からはCLEIAキット¹³⁾が発売され、研究用に測定されている。

なお、HMW-ADPN濃度と生活習慣との関連についての検討では、喫煙習慣は、喫煙なし vs. 現在あり、アルコール摂取は、週4回以下 vs. 週5回以上、運動習慣は、一日平均60分未満 vs. 60分以上の2群間で比較した。

統計解析には、IBM SPSS[®]Statistics ver.22(IBM Japan社、東京)およびStatView[®]ver.5.0J(SAS社、米国)を使用した。男女別に、2群間のHMW-ADPN濃度はノンパラメトリックのMann-Whitney U検定で比較した。また、対数変換後正規分布に近い血清HMW-ADPN、中性脂肪(TG)、ALT、 γ -GTP、BNPは、その対数(log)を単相関・偏相関分析およびステップワイズ多重回帰分析に用いた。

本研究は、「匿名化したデータを用いた観察研究」として慶應義塾研究倫理委員会で承認された(承認番号21-002、登録番号:201601)。

結果

(1) 全対象の血清HMW-ADPN濃度の中央値は男性で2.6 μ g/mL, 女性で4.9 μ g/mLであり, 男女ともメタボリックシンドローム (MetS) 群では非MetS群と比較して有意に低値であった (表1)。
 (2) 男女とも, log [HMW-ADPN] との正の相関はHDL-コレステロール (HDL-C),

BNP, 年齢の順に強く, またBMI, 腹囲, FPG, HbA1c, 血清TG, 赤血球数, ALT, γ -GTP, 尿酸(UA)などと有意な負の相関が認められた (表2)。

(3) 生活習慣に関する質問に回答が得られた男性1,522名, 女性1,008名において, 喫煙・アルコール摂取・運動習慣の有無によるHMW-ADPN濃度の検討では, 男女ともに運動

表1 非メタボリックシンドローム (non-MetS) 群とメタボリックシンドローム (MetS) 群の血清高分子量型アディポネクチン (HMW-ADPN) 濃度

男性	non-MetS	MetS	P
n (%)	1281 (80.8)	305 (19.2)	—
HMW-ADPN (μ g/mL)	2.8 (2.1)	2.0 (1.3)	<0.0001
女性	non-MetS	MetS	P
n (%)	995 (97.6)	24 (2.4)	—
HMW-ADPN (μ g/mL)	4.9 (3.3)	2.95 (1.4)	<0.0001

n (%) または中央値 (四分位範囲), P値はMann-Whitney U検定による

表2 男性1,586名, 女性1,019名における血清高分子量型アディポネクチン (HMW-ADPN) 濃度と各因子との単相関および年齢・BMIで補正後の偏相関

vs.log [HMW-ADPN]	男 性				女 性			
	年齢・BMIで補正後		年齢・BMIで補正後		年齢・BMIで補正後		年齢・BMIで補正後	
	r	P	r'	P	r	P	r'	P
年齢	0.081	0.0012	—	—	0.094	0.0026	—	—
体格指数 (BMI)	-0.351	<0.0001	—	—	-0.381	<0.0001	—	—
腹囲	-0.323	<0.0001	-0.049	NS	-0.347	<0.0001	-0.082	NS
収縮期血圧	-0.148	<0.0001	-0.072	NS	-0.116	0.0002	-0.020	NS
拡張期血圧	-0.119	<0.0001	-0.042	NS	-0.100	0.0014	-0.021	NS
空腹時血糖	-0.132	<0.0001	-0.089	0.0004	-0.158	<0.0001	-0.116	0.0002
ヘモグロビンA1c	-0.185	<0.0001	-0.124	<0.0001	-0.167	<0.0001	-0.148	<0.0001
中性脂肪 (log)	-0.335	<0.0001	-0.239	<0.0001	-0.308	<0.0001	-0.229	<0.0001
HDL-コレステロール	0.385	<0.0001	0.290	<0.0001	0.443	<0.0001	0.329	<0.0001
LDL-コレステロール	-0.150	<0.0001	-0.097	0.0001	-0.156	<0.0001	-0.098	0.0017
赤血球数	-0.213	<0.0001	-0.129	<0.0001	-0.171	<0.0001	-0.098	0.0017
ALT (log)	-0.294	<0.0001	-0.154	<0.0001	-0.097	<0.0001	-0.022	NS
γ -GTP (log)	-0.215	<0.0001	-0.123	<0.0001	-0.215	<0.0001	-0.079	NS
クレアチニン	-0.098	<0.0001	-0.070	NS	-0.098	0.0018	0.028	NS
尿酸	-0.214	<0.0001	-0.129	<0.0001	-0.135	<0.0001	-0.133	<0.0001
BNP (log)	0.226	<0.0001	0.177	<0.0001	0.168	<0.0001	0.108	0.0005

r: 相関係数, r': 偏相関係数, NS: P>0.00313 (Bonferonni 補正)

習慣がある群の方がHMW-ADPNが高い傾向が認められた (表3, 多重比較によるBonferroni補正をすると $P < 0.00833$ が有意である)。また, 運動習慣がない群とある群の2群間で, BMIや腹囲は男女ともに有意差は全くなかったが, HDL-Cは運動習慣がある群の方が明らかに高値であった: 中央値 (四分位範囲) は, 男性で57 (18) vs. 62 (29), $P < 0.0001$, 女性で70 (21) vs. 75 (22),

$P = 0.0012$ 。

(4) \log [HMW-ADPN] を目的変数としたステップワイズ多重回帰分析では, HDL-C, UA, BMI, 性別 (女性), BNP, γ -GTP, 年齢, HbA1cの順に採択された ($F \geq 10$, $P < 0.0001$, $R^2 = 0.417$) (表4)。

表3 男性1,522名, 女性1,008名における生活習慣の有無による血清高分子量型アディポネクチン濃度 (HMW-ADPN, $\mu\text{g/mL}$)

男性		なし	あり	P
喫煙 (現在の)	n (%) HMW-ADPN	1,364 (87.9) 2.7 (2.1)	188 (12.1) 2.5 (2.1)	— 0.109
アルコール摂取 (週5日以上)	n (%) HMW-ADPN	1,011 (65.6) 2.6 (2.2)	530 (34.4) 2.7 (2.2)	— 0.138
運動 (一日平均で60分以上)	n (%) HMW-ADPN	1,045 (68.2) 2.6 (2.1)	487 (31.8) 2.8 (2.1)	— 0.015
女性		なし	あり	P
喫煙 (現在の)	n (%) HMW-ADPN	915 (90.8) 4.9 (3.4)	93 (9.2) 5.1 (3.5)	— 0.759
アルコール摂取 (週5日以上)	n (%) HMW-ADPN	844 (84.4) 4.9 (3.4)	156 (15.6) 5.15 (3.25)	— 0.233
運動 (一日平均で60分以上)	n (%) HMW-ADPN	766 (78.3) 4.8 (3.3)	212 (21.7) 5.3 (3.55)	— 0.032

n (%) または中央値 (四分位範囲), P 値はMann-Whitney U 検定による

表4 男女計2,605名における血清高分子量型アディポネクチン (HMW-ADPN) 濃度を目的変数としたステップワイズ多重回帰分析

vs. \log [HMW-ADPN]	標準回帰係数	F 値	P 値	R^2 の変化
HDL-コレステロール	0.281	256.6	< 0.0001	24.4%
尿酸	-0.119	36.9	< 0.0001	8.9%
BMI	-0.158	70.6	< 0.0001	2.9%
女性	0.184	88.7	< 0.0001	2.3%
BNP (log)	0.110	44.3	< 0.0001	1.7%
γ -GTP (log)	-0.094	26.9	< 0.0001	0.5%
年齢	0.104	37.4	< 0.0001	0.7%
ヘモグロビンA1c	-0.064	15.4	< 0.0001	0.3%

$F \geq 10$, 不採用: 収縮期血圧, 赤血球数, クレアチニン $R^2 = (0.646)^2 = 0.417$

考察

本研究は当大学の健康診断受診者を対象としており、健康意識が比較的高い集団と推測される。高齢の対象者は、重篤な代謝疾患や心血管病、癌などの発症を免れた人たちとも考えられる。ADPNは心不全で上昇することが報告されており¹⁶⁾、本研究においてBNP ≥ 200 以上は除外したが、HMW-ADPNはBNPと弱いながらも正の相関が認められた。

なお、HMW-ADPNを測定できない場合は、その代用として腹囲やTG、HDL-Cなどが有用と考えている。その根拠としては、我々が2004年に「メタボリックシンドローム予防プログラム」としてMetSの男性職員に対して行った保健指導の介入で、食事制限をした人よりも運動を増やした人達の方が多かったが、3ヵ月後にBMIの有意な減少はなかったものの腹囲が平均1.6cm減少したことが挙げられる。TGは食前・食後ともに減少し、HMW-ADPN濃度は有意に増加したことから、BMIよりも腹囲やTGの減少が重要と考えられた⁴⁾。

今回の断面研究から、血清HMW-ADPN濃度はHDL-Cや女性、BNP、年齢とは正の、BMIやUA、 γ -GTP、HbA1cとは負の、それぞれ独立して有意な関係を示した。今後は、生活習慣の改善などの大規模な介入研究が望まれる。

以前我々は、30～59歳の非MetS男性教職員416名における6年間の追跡調査でMetS発症の有無を検討した¹²⁾。ベースラインのHMW-ADPN低値(ELISA法で $2.65 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下)はBMIや年齢の高値とは独立して悪影響を及ぼしていた(ハザード比1.561, 95%信頼区間1.051-2.292, $P = 0.028$)¹²⁾。

他施設からの縦断研究では、非糖尿病の日系米国人から2型DMの発症(男性321名, 女性445名, 平均5.4年の追跡研究¹⁷⁾)において、HMW-ADPN低値は2型DMの発症予測因子であった。また、ADPN低値と2型DM発症の関連は、大規模なメタ解析¹⁸⁾でも報告されて

いる。さらに、米国人男性798名(ADPN別5群からの心筋梗塞発症, 6年間の追跡研究¹⁹⁾)には有意差があり、日本人冠動脈疾患患者149名における心血管イベントの発症(7年間の追跡研究²⁰⁾)でもHMW-ADPN低値(ELISA法で $2.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下)は発症予測因子であった。

なお、CLEIA法で測定した血清HMW-ADPNでは、同時測定の変動係数(CV)は1.0-2.2%, 日差変動も1.7-3.3%であり¹³⁾、ELISA法のそれぞれ2.4-3.0%および4.2-5.1%^{14), 15)}と比較してかなり良好であった⁵⁾。CLEIA法で測定した血清HMW-ADPN値は、検量物質値付けの見直しにより従来のELISA法の約2分の1であったが、ELISA法との相関係数は0.993 ($n = 185$)と非常に良好であった¹³⁾。また、その回帰式($Y = 0.504X + 0.172$)から、ELISA法による $2.6 \sim 2.65 \mu\text{g}/\text{mL}$ はCLEIA法による $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ に相当することが分かった⁵⁾。

以上まとめると、血中アディポネクチン濃度は遺伝や肥満、喫煙などで低下し、MetSや2型糖尿病、心血管イベントの発症予測因子である。HMW-ADPNがELISA法で $2.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下(全量ADPNでは $4.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下に相当)、2010年以降のCLEIA法で $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の者は、生活習慣の改善などが必要と考えられる。

本論文の執筆に関連し、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。また、本論文の要旨は、第52回日本動脈硬化学会シンポジウム3「アディポサイトカインの進歩」(2020年7月17日から31日までオンラインにて開催)で発表した。

文献

- 1) Maeda K, Okubo K, Shimomura I, et al. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 1996 ; 221 : 286-289.
- 2) Nakano Y, Tobe T, Choi MN, et al. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)* 1996 ; 120 : 803-812.
- 3) Arai Y, Takayama M, Abe Y, et al. Adipokines and aging (Review). *J Atheroscler Thromb* 2011 ; 18 : 545-550.
- 4) Hirose H, Yamamoto Y, Seino-Yoshihara Y, et al. Serum high-molecular weight adiponectin, as a useful marker for the evaluation and care of subjects with metabolic syndrome and related disorders (Review). *J Atheroscler Thromb* 2010 ; 17 : 1201-1211.
- 5) Hirose H. High-molecular-weight adiponectin and Ningen Dock : useful biomarker of metabolic syndrome and related disorders (Review). *Ningen Dock International* 2014 ; 1 : 7-15.
- 6) Frizzell N, Rajesh M, Jepson MJ, et al. Succination of thiol groups in adipose tissue proteins in diabetes : succination inhibits polymerization and secretion of adiponectin. *J Biol Chem* 2009 ; 284 : 25772-25781.
- 7) Waki H, Yamauchi T, Kamon J, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes : Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 40352-40363.
- 8) Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, et al. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 12152-12162.
- 9) Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, et al. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res* 2004 ; 94 : e27-31.
- 10) Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, et al. Correlation of adipocyte-derived protein, adiponectin with insulin resistance index and serum HDL-cholesterol, independent of body mass index in the Japanese population. *Clin Sci* 2002 ; 103 : 137-142.
- 11) Hirose H, Kawai T, Yamamoto Y, et al. Effects of pioglitazone on metabolic parameters, body fat distribution, and serum adiponectin levels in Japanese male patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2002 ; 51 : 314-317.
- 12) Seino Y, Hirose H, Saito I, et al. High molecular weight adiponectin is a predictor of progression to metabolic syndrome : a population-based 6-year follow-up study in Japanese men. *Metabolism* 2009 ; 58 : 355-360.
- 13) Hayama S, Higuchi T, Miyakoshi H, et al. Analytical evaluation of a high-molecular-weight (HMW) adiponectin chemiluminescent enzyme immunoassay. *Clin Chim Acta* 2010 ; 411 : 2073-2078.
- 14) Nakano Y, Tajima S, Yoshimi A, et al. A novel enzyme-linked immunosorbent assay specific for high-molecular-weight adiponectin. *J Lipid Res* 2006 ; 47 : 1572-1582.
- 15) Tanita T, Miyakoshi H, Nakano Y. Performance of ELISA for specific measurement of high-molecular-weight (HMW) adiponectin. *J Immunol Methods* 2008 ; 333 : 139-146.
- 16) von Eynatten M, Hamann A, Twardella D, et al. Relationship of adiponectin with markers of systemic inflammation, atherogenic dyslipidemia, and heart failure in patients with coronary heart disease. *Clin Chem* 2006 52 : 853-859.
- 17) Nakashima R, Kamei N, Yamane K, et al. Decreased total and high molecular weight adiponectin are independent risk factors for the development of type 2 diabetes in Japanese-Americans. *J Clin Endocrinol Metab* 2006 ; 91 : 3873-3877.
- 18) Li S, Shin HJ, Ding EL, et al. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes : a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2009, 302 : 179-188.
- 19) Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, et al. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004 ; 291 : 1730-1737.
- 20) Inoue T, Kotooka N, Morooka T, et al. High molecular weight adiponectin as a predictor of long-term clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2007 ; 100 : 569-574.